

6-12

第25卷 第4期
1997年8月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 4
Aug. 1997

②

CaMV 基因Ⅵ在拟南芥上的遗传转化及交叉保护

Milner, J J

巩振辉¹ Milner J J² 何玉科³ 陈启林¹ 薛万新¹

(1 西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

(2 Botany Department, Glasgow University, Glasgow G12 8QQ UK)

(3 中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘 要 通过对CaMV CABB-BJI 和 Bari-1 株系基因Ⅵ的克隆和转化, 在根癌农杆菌菌株GV3101的介导下, 利用真空渗入法获得了转化CABB-BJI 和 Bari-1 基因Ⅵ的拟南芥转基因植株。分子检测表明, 基因Ⅵ已整合进拟南芥基因组并有不同程度的表达。在转基因植株中, 出现了类似病毒感染症状、多生长点及花粉生活力较低等个体的变异株。而多数转基因植株(占转基因植株70.4%)为无症状的正常植株。对转化CaMV Bari-1 株系基因Ⅵ的9个无症状转基因株系接种CaMV CABB-BJI 病毒抗性表明, 9个转基因株系表现出了不同的抗性。

关键词 CaMV 基因Ⅵ, 遗传转化, 转基因植株表型, 遗传工程的交叉保护, 拟南芥

中图分类号 Q785

植物病毒病是严重危害农业生产的重要病害, 抗病毒病育种是植物育种学家长期探索与关注的焦点, 植物分子生物学和基因转移技术的发展为解决这一问题提供了手段。Powell A 等^[1]首次报道了遗传工程的交叉保护, 他们发现表达TMV 外壳蛋白(CP)的转基因烟草对TMV 具有一定抗性。随后, 许多学者分别培育出了表达AIMV, CMV, TRV, TSV, TEV 和PVT 等病毒CP 的不同转基因植株, 并对其抗性进行了研究分析^[2]。这些研究说明利用病毒的某些基因有可能成为控制病毒病的重要策略。花椰菜花叶病毒(CaMV)在遗传工程研究方面已展示出极显著的优越性^[3]。

1 材料与方法

1.1 供试材料与CaMV 基因Ⅵ的PCR 扩增

供试植物材料为野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型Landsberg erecta。所用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株(GV3101(pMp90))^[4]由Dr Ian Graham 提供。CaMV 温和株系Bari-1 和严重花叶、发育迟缓株系CABB-BJI 基因组分别克隆在pUC9 的Sal I 位点和pGEM5 的Sal I 位点, 由Dr Covey S N 提供。2个株系基因Ⅵ的扩增均在Hybaid Omni Gene PCR 仪上进行。引物同文献^[5]。反应是在pfu DNA 多聚酶催化下进行, 反应液总量为50 μL, CABB-BJI 基因Ⅵ的扩增是先在95℃预热变性处理5 min, 再进入循环(变性95℃, 1 min; 退火50℃, 5 min; 延伸72℃, 5 min), 共30个循环, 最后一个循环“延伸”延长7.5 min, Bari-1 基因Ⅵ的扩增是经95℃下预热变性5 min, 再

收稿日期 1996-12-30

作者简介 巩振辉, 男, 1957年生, 副教授, 硕士

进入循环(变性 95℃, 1 min; 退火 40℃, 7 min; 延伸 72℃, 7 min)共 30 个循环, 最后的一个循环“延伸”延长 8.5 min。

1.2 CaMV 基因 VI 的重组、克隆与转化

将 PCR 产品在低熔点琼脂糖凝胶中电泳。用单面刀片切下 PCR 扩增片段, 经 ELU-TIP-d 柱分别获得纯化了的 CABB-BJI 基因 VI 和 Bari-1 基因 VI。将所扩增纯化了的 2 个基因 VI 和 pJO530 质粒(是 Bin19 所衍生的一个质粒, 含有 CaMV35s 启动子, 携带新霉素磷酸转移酶基因)分别经 Xba I 和 Kpn I 双解后, 在 T₄ DNA 连接酶作用下, 获得重组质粒 pJO530::CABB-BJI G VI 和 pJO530::Bari-1 G VI。重组质粒经转入 *E. coli* DH5α 菌种增殖、鉴定后, 采用深冻-融解法(freeze-thaw method)将其直接转入 GV3101(pMp90)菌种, 分别获得 BJI 菌株和 Bari 菌株。

1.3 基因转移与筛选

方法同文献[5]。

1.4 转基因植株分析

PCR 分析 植株叶片 DNA 的提取采用微量提取法^[6]。PCR 反应是在 Idaho Technology 公司所生产的气热交换 PCR 仪上进行。反应条件同文献[5]。

Southern 杂交分析 DNA 转移、探针制备和 Southern 杂交方法同文献[7]。

ELISA 检测 方法同文献[5]。

1.5 交叉保护研究

材料 CaMV CABB-BJI 毒源由英国格拉斯哥大学植物系 Wolfson 实验室提供, 在芜菁上保存繁殖。

接种毒源的制备 采集系统感染 CaMV CABB-BJI 毒源的芜菁叶片 10 g, 加少许金钢砂在 TE 缓冲液中研磨成浆液, 最后再用 TE 缓冲液稀释至 50 mL 即可接种。在转基因植株 T₂ 代 4~5 叶期, 用玻棒蘸取约 2 μL 接种毒源接种于第二或第三片新叶上, 接种后接种植株置于 20℃±2℃的温室进行培养。培养 25 d 后统计发病率和病情指数。

病株分级 依据病株发病严重程度划分 4 级。0 级, 无症状; 1 级, 明脉, 花叶不明显; 3 级, 系统花叶明显, 但生长势与对照无明显差异; 5 级, 重花叶, 植株矮缩。

2 结果与讨论

2.1 CaMV 基因 VI 的分离、重组、克隆与转化

分别以 CaMV CABB-BJI 株系和 CaMV Bari-1 株系基因组 DNA 重组于 pUC9 和 pGEM5 Sal I 位点的 2 个重组 DNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增获得了 CaMV CABB-BJI 基因 VI (图 1; A, B) 和 CaMV Bari-1 基因 VI (图 1; C, D)。将这 2 个基因纯化后, 重组于质粒 pJO530 的 Kpn I /Xba I 位点。重组质粒增殖鉴定后转入农杆菌菌种 GV3101。提取转化农杆菌菌株质粒 DNA, 酶切分析表明, 目标基因已整入农杆菌菌株(图 2)。

2.2 CaMV 基因 VI 在拟南芥上的转化与检测

经真空渗入法在转化植株上采收了大量种子(T₀代)^[5]。对由 BJI 菌株转化的 40 mg 种子(约 2000 粒), 在含潮霉素(30 mg/mL)的 1/2MS 培养基上进行了筛选, 获得了 13 株抗潮霉素的植株, 转化率为 0.65%, 其中 2 株转化植株在移栽后 3 周死亡。在含有潮霉素

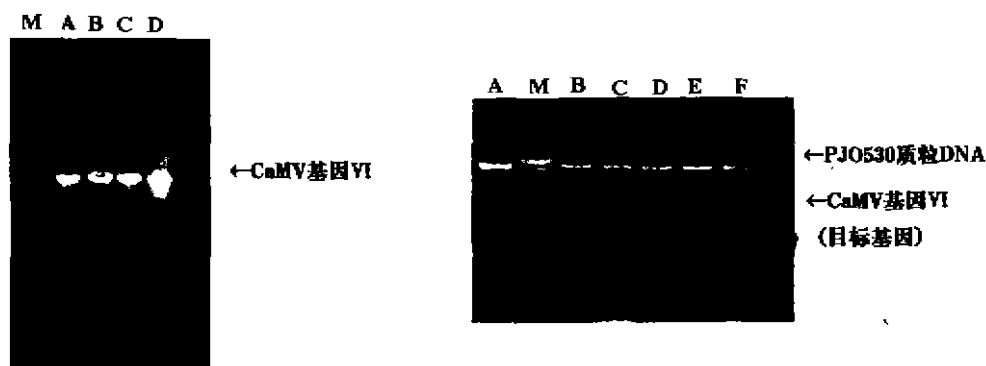


图 1 以 CaMV CABB-BJI 和 Bari-1 株系基因组重组 DNA 为模板的 CaMV 基因 VI 的 PCR 扩增

M. DNA 分子标样, Hind III 消解 λ DNA;
A, B. CaMV CABB-BJI 基因 VI 的 PCR 扩增带;
C, D. CaMV Bari-1 基因 VI 的 PCR 扩增带

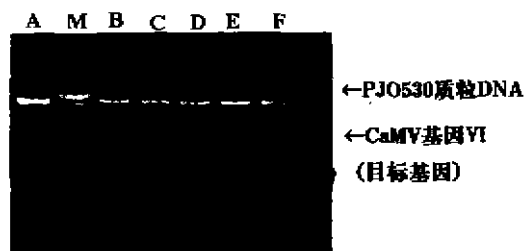


图 2 从构建的农杆菌 BJI 菌株、Bari 菌株所提取的质粒 DNA 的限制内切酶 (KpnI/XbaI) 双酶分析

M. DNA 分子标样, Hind III 消解 λ DNA;
A, B, C. BJI 菌株的酶切带;
D, E, F. Bari 的酶切带

的培养基上, 它们均能萌发生根, 经 1 周萌发培养, 其根伸入培养基达 4~6 cm, 说明其抗潮霉素, 而移栽于营养钵, 虽能很快缓苗, 但不久生长停滞, 严重黄化, 最终导致死亡。CABB-BJI 是引起拟南芥严重花叶、生长迟缓的株系。基因 VI 与 CaMV 症状的严重程度、缺绿和寄主范围等有关^[8~10]。因此, 抗潮霉素的转化植株死亡的可能原因是基因 VI 在植物基因组的位置效应或整合的位点数过多。

通过对 Bari 菌株转化的 T_0 代种子 40 mg (约 2 000 粒) 进行抗潮霉素筛选, 获得了 16 株抗潮霉素植株, 转化率为 0.8%。需指出的是, 转化株 LBar1 D2 T_1 代幼苗经 PCR 分析扩增出了目标基因——基因 VI 带, 但在其 T_1 植株上采收的种子 (2 次共筛选 1 000 粒) 均不抗潮霉素。造成这一现象是基因 VI 未整合进植

物基因组而仅存在于细胞质, 或新霉素磷酸转移酶基因不表达, 或丢失, 或其它原因, 尚待进一步探索。

获得抗潮霉素的转化植株经 PCR 分析, 均扩增出了目标基因带 (图 3)。Southern 杂



图 3 CaMV 基因 VI 转化植株的 PCR 分析

M. 1 kb DNA 标样; CK. 非转化拟南芥植株 DNA 与 pUC9::Bari-1 GVI DNA 混合; 1~14. 分别为拟南芥转基因植株 LBar1 1D1, LBar1 6C1, LBar1 1B1, LBar1 1A1, LBar1 1C2, LBar1 1D3, LBar1 6A1, LBar1 2E1, LBar1 2D1, LBar1 6C2, LBar1 2D2, LBar1 6B1, LBair 1A2 和 LBair 6D3

交同样获得目标基因杂交带(图4)。ELISA 检测结果表明有基因Ⅵ产物的合成。在492 nm 波长下,如以非转化植株ELISA 的结果为0.0000,则不同转化植株为0.1620~0.6375。其中,转化CABB-BJI0 基因Ⅵ的合成产物为0.1620~0.2125,转化Bari-1 基因Ⅵ的合成产物为0.1845~0.6375。这一结果说明了基因Ⅵ已整合进拟南芥基因组,并获得了不同程度的表达。



图4 CaMV 基因Ⅵ转基因植株的 Southern 杂交分析

M, 1 kb DNA 标样杂交带;CK 和 1~14 杂交带同图3注

2.3 CaMV 基因Ⅵ转化植株的特征特性

在转化CABB-BJI 基因Ⅵ的11个存活的转基因植株中,有3株变异株,占转基因植株的27.27%,其余转基因植株(占转基因植株72.73%)与非转化植株的表型没有差异。在3株变异株中,LBJI6A1,外叶出现类似病毒感染的花叶,生长较迟缓;LBJI6B1,叶浅黄,但无明显花叶现象,生长较迟缓;LBJI6C1,叶深绿,叶缘有缺刻,但生长缓慢(图5)。

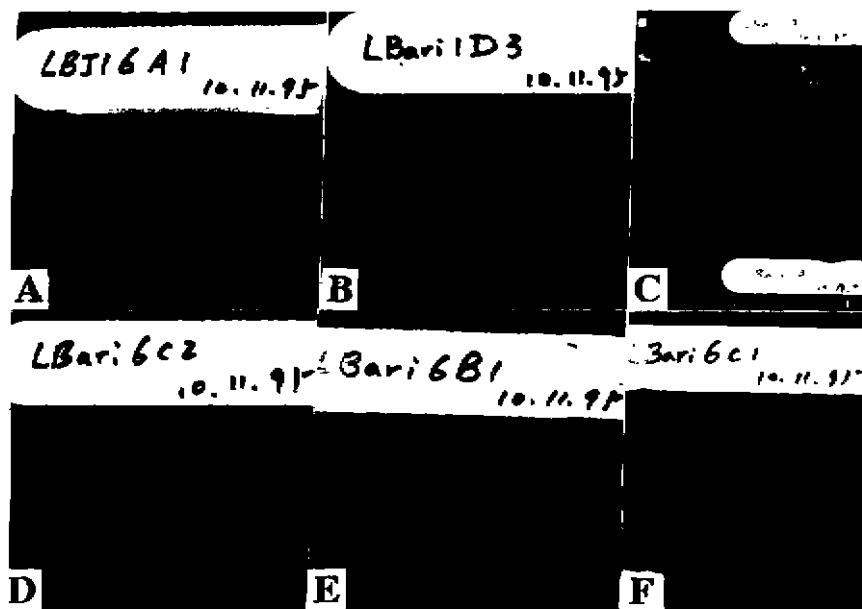


图5 拟南芥转基因植株表型

A. LBJI6A1; B. LBJI6B1; C. 右上、左上、右下、左下分别为 LBJI6A2, LBJI6D3, LBJI6A1 和 LBJI6B1; D. LBJI6C2; E. LBJI6B1; F. LBJI6C1

CaMV 基因 VI 蛋白是一个多功能蛋白,与 CaMV 症状的严重度、症状类型、寄主范围等有关^[11]。基因 VI 的表达引起了类似 CaMV 感染的症状,这一结果与 Schoelz J E 等人的研究结果一致^[12]。但多数转基因植株无症状,这种表型效应是基因转化系统调控细胞转录机制的结果,从而导致转录的蛋白过多或过少,或是基因 VI 蛋白的其它功能所致。

在转化 Bari-I 基因 VI 的转基因植株中,出现 5 株变异株,占转基因植株的 31.25%,其余 68.75%的转基因植株与非转基因植株表型没有差异。在 5 株变异株中,LBari1D3,严重花叶,生长迟缓,叶缘有缺刻;LBari1A2,叶片黄化,叶缘有缺刻,生长迟缓;LBari1C2,叶色正常,但生长较非转化植株慢;LBari1B1,则出现 5 个生长点(多头性)同时发育的现象(图 5)。自交结果分析表明,这种多头性受一对基因控制;LBari1C1,花粉生活力较低,天然自交结籽率极低(单株结籽 100 粒以下),角果短小,人工测交结实正常。

值得指出的是,CaMV Bari-1 株系是一个温和株系,在自然或人工接种条件下感染拟南芥,不出现任何症状。而将其基因 VI 转入拟南芥,笔者发现了 3 株转基因植株出现了严重花叶、黄化、生长迟缓等类似病毒感染表型。CABB-BJI 株系基因 VI 导入不同植物,部分转化植株出现严重缺绿表型已有报道^[12,13],而尚未见 Bari-I 基因 VI 导入转化植株引起严重的缺绿或花叶症状的报道。比较 Bari-1 基因 VI 转化植株与 CABB-BJI 基因 VI 转化植株的 ELISA 结果不难发现,基因 VI 产物的合成前者平均是后者 128.25%。显然,导致 Bari-1 基因 VI 转化植株出现类似病毒病症状与其基因 VI 所转录蛋白过多有关。

2.4 CaMV 基因 VI 转化植株的交叉保护作用

在温室内,用 CaMV 严重花叶、发育迟缓株系——CABB-BJI 对转化 Bari-I 基因 VI 的非变异植株(表型无症状)进行抗病性鉴定。同时,以野生型拟南芥生态型 Landsberg erecta 非转化植株作为对照,在同样条件下接种 CaMV CABB-BJI 病毒进行抗病性鉴定(附表)。与对照相比,除 LBari1A1 和 LBari2D2 与对照发病率均为 100%外,其余供试转基因株系的发病率和病情指数均有所下降,LBari1A1 和 LBari2D2 的病情指数也较对照明显低。转基因株系表现出较好的抗性。这一结果说明在 CaMV 基因 VI 转化植株中,存在着遗传工程交叉保护。

附表 CaMV Bari-1 基因 VI 转化植株对 CABB-BJI 株系的抗性表现

接种株系	接种植株数	群体抗性表现		
		发病率(%)	病情指数	抗性反应类型
LBari1D1	29	69.0	27.6	+
LBari1C1	30	33.3	29.3	+
LBari1B1	30	23.3	15.3	+
LBari1A1	27	100.0	37.8	±
LBari1C2	30	36.7	16.7	+
LBari1A1	30	56.7	24.7	+
LBari2E1	35	22.9	9.1	+
LBari2D1	32	6.3	3.8	+
LBari2D2	30	100.0	55.6	-
对 照	45	100.0	81.3	-

注:1. 病害反应类型中,“+”表示抗病;“-”表示感病;“±”表示中抗。

2. 对照为野生型拟南芥生态型 Landsberg erecta。

很早人们就观察到交叉保护作用现象并用之于作物保护。Stratford 等^[14]对 CaMV 不同株系的交叉保护研究表明,在芜菁上,温和株系 Bari-1 对严重花叶株系 CABB-BJI 具有交叉保护作用。但是,这种保护作用存在着许多潜在的危险,使其应用受到很大限制。例如起保护作用的病毒可能侵害别的作物,也可能由于病毒的突变引起更严重的病毒传播。取代以往的交叉保护作用,遗传工程的交叉保护受到了广泛的关注。但多数学者的研究集中在利用 CP 蛋白基因、54 kD 蛋白基因、病毒卫星 RNA 基因、反义 RNA 基因等^[1~3]。而关于 CaMV 基因 VI 的遗传工程交叉保护尚未见研究报道。CaMV 基因 VI 提供的交叉保护作用的机理是什么? 是基因 VI 蛋白所表达的结果,抑是基因 VI 所诱导的抗病性,这一抗病性与启动子、转化系统及基因 VI 在植物基因组位点的关系等,这些问题将会成为今后这一领域研究的又一焦点。

参 考 文 献

- 1 Powell A, Nelson R S, DeBlock *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986(232): 738~743
- 2 荆玉祥, 匡廷云, 李德葆. 植物分子生物学——成就与前景. 北京: 科学出版社, 1995: 193~214
- 3 Covey S N, Roger H. Genetic engineering with double-stranded and viruses. In: Michael A W, Jeffrey W D ed. *Genetic Engineering with Plant Viruses*. Boca Raton, Florida: CPC Press, 1992, 218~245
- 4 Koncs C, Schell J. The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet*, 1986(204): 383~396
- 5 巩振辉, Milner J J, 何玉科. 拟南芥基因转移新方法——真空渗入法的研究. *西北植物学报*, 1996, 16(3): 277~283
- 6 巩振辉, Cecchini E, Milner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量 DNA 提取方法. *西北农业大学学报*, 1997, 25(1): 45~48
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual* (2nd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 Daubert S, Roth G. Point mutations in cauliflower mosaic virus gene VI confer host-specific symptom changes. *Mol Plant-microbe Int*, 1990(5): 341~345
- 9 Stratford R, Covey S N. Segregation of cauliflower mosaic virus symptom genetic determinants. *Virology*, 1989 (172): 451~459
- 10 James S, Robert J S, Stephen D. Region VI of cauliflower mosaic virus encodes a host range determinant. *Molecular and Cellular Biology*, 1986, 6(7): 2632~2637
- 11 Carolien Z, Thomas H. Cauliflower mosaic virus gene VI controls translation from dicistronic expression units in transgenic Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 1992(4): 1471~1474
- 12 Schoelz J E, Goldberg K B, Kiernan J. Expression of cauliflower mosaic virus (CaMV) in transgenic *Nicotiana bigelovii* complements a strain of CaMV defective in long distance movement in nontransformed *N. bigelovii*. *Mol Plant-microbe Interact*, 1991(4): 350~355
- 13 Call A B, Jerry D J, Stephen H H. Cauliflower mosaic virus gene produces a symptomatic phenotype in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988(85): 733~737
- 14 Stratford R, Covey S N. Changes in turnip leaf messeng RNA populations during systemic infection by severe and mild strains of cauliflower mosaic virus. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 1988(1): 234~239

The Genetic Transformation and Genetically Engineered Cross Protection of CaMV Gene VI in *Arabidopsis Thaliana*

Gong Zhenhui¹ Milner J J² He Yuke³ Chen Qilin¹ Xue Wanxin¹

(1 Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(2 Department of Botany, Glasgow University, Glasgow, G12 8QQ, UK)

(3 Shanghai Institute of Plant Physiology, Academic Sinica, Shanghai, 200032)

Abstract *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 mediated transgenic plants containing CABB-BJI gene VI and Bari-1 gene VI were obtained in *Arabidopsis thaliana* by using the method of vacuum infiltration through the cloning and transformation of gene VI of cauliflower mosaic virus (CaMV) strains CABB-BJI and Bari-1. The molecular assay showed that the gene VI was integrated into plant genomes of *Arabidopsis thaliana* and had expressions of various degrees. The mutants of different types, including virus symptom-like phenotype, multiple growing points and lower viability of pollen, were found among the transgenic plants. Most of the transgenic plants (70.4 percent), however, were symptomless. The strain CABB-BJI of CaMV artificially inoculated nine lines of symptomless transgenosis from the transformed gene VI of CaMV strain Bari-1. The results of the resistance indicated that the nine lines had various resistance reactions.

Key words gene VI of CaMV, genetic transformation, genotype of transgenic plants, genetically engineered cross-protection, *Arabidopsis thaliana*

欢迎订阅 1998 年《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术刊物,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物和西瓜、甜瓜等方面未经发表的科研报告及研究简报、专题文献述评、经过两省(直辖市)级鉴定的新品种、学术活动报道及新书评介等。读者对象主要是园艺科研人员、大专院校师生及专业技术人员。

本刊为季刊,16开本,104页,激光照排,胶版印刷(胶版纸)。每期定价5.30元,全年21.20元。国内外公开发售,全国各地邮局办理订阅,漏订者可直接寄款本编辑部订购。国内邮发代号82-471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号Q448。电话:(010)62174433-2529。